

Partial Translation of JP11-123093

[0007]

[Means for Solving the Problem] In consideration of such
5 present circumstances, the inventor has made deep study to find
a DNA primer having a base sequence specific to the mycetoma
of a bacterium belonging to the genus Bifidobacterium while
finding that the mycetoma of a bacterium belonging to the genus
Bifidobacterium can be rapidly and simply identified and
10 analyzed by PCR of DNA deriving from the bacterium extracted
from a specimen without incubating the bacterium when the DNA
primer is employed, to complete the present invention.

[0008] The present invention provides a primer for a bacterium
belonging to the genus Bifidobacterium having a base sequence
15 selected from formulas 1 to 21 or a sequence complementary to
the base sequence.

[0009] The present invention also provides a method of
identifying the mycetoma of a bacterium belonging to the genus
Bifidobacterium employing at least one or two such primers.

20 [0010] The present invention further provides a method of
specifically detecting a bacterium belonging to the genus
Bifidobacterium including steps of (1) extracting DNA from a
specimen, (2) performing PCR reaction with at least one or two
aforementioned primers and (3) detecting a DNA fragment
25 amplified through the step (2).

[0011]

[Embodiment of the Invention] 16SrRNA genes highly reliable as the indices of phyletic systematics were employed as the targets of primers according to the present invention.

5 [0012] The primers were obtained by comparing base sequences obtained by the inventor through sequencing with databases (DDBJ, Genbank etc.) and base sequences newly obtained by the inventor through sequencing as comparative objects and studying the same. More specifically, the mycetomata
 10 (standard strains) newly subjected to sequencing of 16SrRNA genes by the inventor as the comparative objects were the Bifidobacterium angulatum ATTC27535 strain, the Bifidobacterium animalis ATTC25527 strain, the Bifidobacterium boum JCM1211 strain, the Bifidobacterium choerinum ATCC27686 strain, the Bifidobacterium dentium ATCC27534 strain, the Bifidobacterium gallicum JCM8224 strain, the Bifidobacterium gallinarum JCM6291 strain, the Bifidobacterium indicum JCM1302 strain, the Bifidobacterium infantis ATCC15697 strain, the Bifidobacterium magnum JCM1281
 15 strain, the Bifidobacterium mercyicum JSM8219 strain, the Bifidobacterium pseudocatenulactum JCM1200 strain, the Bifidobacterium pseudolongum ss.globosum JCM5820 strain, the Bifidobacterium pseudolongum ss. pseudolongum JCM1205 strain, the Bifidobacterium pullorum JCM1214 strain, the
 20 Bifidobacterium ruminantium JCM8222 strain, the

Bifidobacterium saeculare DSM6531 strain, the Bifidobacterium
subtile DSM20096 strain, the Bifidobacterium denticolens
DSM10105 strain, the Bifidobacterium inopionatum DSM10107
strain and the Bifidobacterium catenulactum ATCC27539 strain,

5 the sequences of which were registered in the database DDBJ
of National Institute of Genetics.

[0013] Alignment was performed between the mycetomata of the
genus Bifidobacterium. Consequently, it has been found that
sequences specific to a large number of mycetomata are present
10 in areas V2 and V3 of nine variable regions in total (Fig. 1).
It has also been recognized that Bifidobacterium longum and
Bifidobacterium infantis as well as Bifidobacterium
catenulateum and Bifidobacterium pseudocatenulatum had
sequences capable of distinguishing the same from each other
15 in an area V6 and the areas V1 and V6 respectively (Fig. 2).
Therefore, PCR primers were designed with reference to targets
of the aforementioned areas. The lengths of oligonucleotides
were 17 to 21 bp, which are most preferable lengths in
manipulation. In employment, however, base sequences of
20 several to several 10 bp adjacent to the oligonucleotides may
be increased/decreased in the respective 16SrRNA genes.

[0014] Among the primers obtained in the aforementioned manner,
those having sequences described in formulas 1 and 2 are DNA
primers specific to Bifidobacterium adolescentis.

25 [0015] Further, those having sequences described in formulas

3 and 4 are DNA primers specific to Bifidobacterium bifidum.

[0016] Further, those having sequences described in formulas 5 and 6 are DNA primers specific to Bifidobacterium breve.

[0017] Further, those having sequences described in formulas 5 7 and 8 are DNA primers specific to Bifidobacterium longum.

[0018] Further, those having sequences described in formulas 9 and 10 are DNA primers specific to Bifidobacterium pseudolongum.

[0019] Further, those having sequences described in formulas 10 11 and 12 are DNA primers specific to Bifidobacterium angulatum.

[0020] Those having sequences described in formulas 13 and 14 are DNA primers specific to Bifidobacterium catenulatum.

[0021] Further, those having sequences described in formulas 15 15 and 16 are DNA primers specific to Bifidobacterium pseudocatenulatum.

[0022] Further, those having sequences described in formulas 17 and 18 are DNA primers specific to Bifidobacterium gallicum.

[0023] Further, those having sequences described in formulas 20 7 and 19 are DNA primers specific to Bifidobacterium infantis.

[0024] The primers described in formulas 7 and 21 formed bands with 16SrRNA genes of not only B. longum but also B. infantis and B. suis. However, these three mycetomata are systematically extremely allied species having the same peptide strands and murein (acid) of cell walls with DNA-DNA

homology of about 70 % and the *B. longum* group can be recognized as hereinabove described, and hence the primers can be used for identifying the mycetoma of bacteria belonging to the genus *Bifidobacterium* with no particular problem.

- 5 [0025] Further, the primers described in formulas 14 and 20 formed bands also with 16SrRNA genes of *B. catenulateum* and *B. pseudocatenulatum*. However, these two mycetomata can also be recognized as the *B. catenulateum* group for a similar reason, and hence the primers can also be used with no hindrance.
- 10 [0026] The oligonucleotide primers designed in the aforementioned manner are artificially synthesized by a DNA synthesizer according to the base sequences thereof. The species specificity thereof was confirmed with reference to band formability of the primers with respect to 16SrRNA of
- 15 bacteria belonging to the genus *Bifidobacterium* and representative intestinal bacteria. As a result, the primers had no problems in specificity with respect to *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. pseudolongum*, *B. catenulateum*, *B. anglerum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. gallicum* and *B. infantis*
- 20 among the above. On the other hand, the primer for *B. longum* formed a band also with a 16SrRNA gene of *B. suis*. However, these two mycetomata, which are systematically extremely allied species with DNA-DNA homology of 75 to 78 % and similarity of 16SrRNA sequences exceeding 99.7 %, must be reclassified
- 25 into the same mycetoma, and no hindrance conceivably results

even if the species cannot be distinguished from each other.

[0027] The inventive primer has specificity as described above, whereby the mycetoma can be simply identified by extracting DNA directly from colonies formed on selective media TOS and

5 MPN for bacteria belonging to the genus Bifidobacterium or incubated bacterial bodies and investigating reactivity with respect to each primer. When employing the inventive primer, distribution can be investigated at the mycetoma level of each individual without performing incubation. In relation to this,

10 the following methods can be listed, for example:

[0028] First, DNA is extracted from dejection or the like as a PCR sample. The DNA is preferably extracted from a diluent of dejection or the like by the constant Marmur method, the modified enzyme method or the benzyl chloride method. Although

15 such a method is slightly complicated, DNA can be extracted from wide-ranging mycetomata with an excellent yield in the enzyme method. In addition to the aforementioned method, the phenol process or the like can also be preferably applied to DNA extracted from a pure-cultured bacterium or the like.

20 Further, part of a bacterial body suspended in a buffer or sterile water and heated to 95°C for about 15 minutes can also be subjected to PCR as a template.

[0029] A species-specific DNA arrangement (PCR product) can be obtained by combining the extracted DNA with a species-

25 specific primer and performing amplification. When the primer

is used for PCR, two types of primers are preferably employed as a set in general. When the primers related to the formulas 1 and 2 are employed, for example, amplification takes place between the primers only in DNA of *Bifidobacterium adolescentis* among a large number of types of bacterial groups, so that the same can be identified. When two types of primers are employed as a set as described above, the primers must be in combination of leading strands and lagging strands. The annealing temperature is set substantially constant in PCR reaction, and hence five types of primers can also be simultaneously assayed. When the template DNA is previously diluted stepwise for obtaining the detection limit and subjected to similar analysis, the target mycetoma can also be quantified.

[0030] When the DNA obtained in the aforementioned manner is electrophoresed, the mycetoma can be identified from presence/absence of a band and the employed primers.

[0031] The inventive primer, having a mycetoma-specific arrangement, can singularly be used as a probe. Further, a single or a plurality of inventive primers can be combined with another well-known universal primer or oligonucleotides.

[0032] When the inventive primer is employed, further, the intestine or the like of a human or an animal can also be analyzed. While it is impossible to detect those other than the mycetoma of a bacterium belonging to the genus *Bifidobacterium* under the present circumstances, various information such as the

health condition is obtained if the distribution and the number of the bacterium belonging to the genus Bifidobacterium are recognized. When the inventive primer is combined with other various primers for bacteria, it is also possible to grasp the
5 total image of a bacterial flora.
veral 10 bases.

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **11123093 A**(43) Date of publication of application: **11.05.99**(51) Int. Cl. **C12N 15/09****C12Q 1/68****G01N 33/48****G01N 33/50****/(C12N 15/09 , C12R 1:01), (C12Q
1/68 , C12R 1:01)**(21) Application number: **10229583**(22) Date of filing: **14.08.98**(30) Priority: **14.08.97 JP 09219567**(71) Applicant: **YAKULT HONSHA CO
LTDYAKULT BIO SCIENCE
KENKYU ZAIDAN**(72) Inventor: **MATSUKI TAKAHIRO
WATANABE KOICHI
TANAKA RYUICHIRO
KOYAZU HIROSHI**(54) **PRIMER FOR BACTERIUM BELONGING TO
GENUS BIFIDOBACTERIUM**V2, V3, and V6 areas in its variable region, followed by
the synthesis of sequence using a DNA synthesizer.

(57) Abstract:

COPYRIGHT: (C)1999,JPO

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new primer which comprises a nucleic acid having a specific base sequence of a sequence complementary to the sequence, does not require culturing a bacterium, and is capable of identifying/detecting a bacterium belonging to the genus Bifidobacterium quickly and simply.

SOLUTION: The primer, which comprises a base sequence selected from formula I, II, III, or IV, or a sequence complementary to the base sequence, does not require culturing a bacterium, is capable of identifying/detecting a bacterium belonging to the genus Bifidobacterium quickly and simply, is capable of identifying/analyzing enteric microflora of animals including human, and is useful, for example, to understand the health of an individual or to study intraenteric phthology, is obtained by designing a species-specific primer based, for example, on a 16S rRNA gene sequence of a bacterium belonging to the genus Bifidobacterium, which is obtained from a database, finding a species- specific sequence in V1,

CTCCAGTTGGATGCATGTC I**CGAAGGCTTGCTCCCACT II****CCACATGATGCCATGTGATTG III****CCGAAGGCTTGCTCCCAAA IV****CCGGATGCTCCATCACAC V****ACAAAGTGCCCTGCTCCCT VI**

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 1 1 - 1 2 3 0 9 3

(43) 公開日 平成11年(1999)5月11日

(51) Int. Cl. ° 識別記号

C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 Q 1/68

G 0 1 N 33/48

33/50

// (C 1 2 N 15/09 Z N A

審査請求 未請求 請求項の数 4

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 A

G 0 1 N 33/48 Z

33/50 P

O L

(全 1 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-229583

(22) 出願日 平成10年(1998)8月14日

(31) 優先権主張番号 特願平9-219567

(32) 優先日 平9(1997)8月14日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000006884

株式会社ヤクルト本社

東京都港区東新橋1丁目1番19号

(71) 出願人 597099885

財団法人ヤクルト・バイオサイエンス研究

財団

東京都港区東新橋1丁目1番19号

(72) 発明者 松木 隆広

東京都港区東新橋1-1-19 株式会社ヤク

ルト本社内

(74) 代理人 弁理士 有賀 三幸 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ビフィドバクテリウム属細菌用プライマー

(57) 【要約】

【解決手段】 配列番号 1 ～ 2 1 から選ばれる塩基配列又は該塩基配列に相補的な配列を有するビフィドバクテリウム属細菌用プライマー、並びにこのプライマーを使用するビフィドバクテリウム属細菌菌種の同定・検出法。

【効果】 菌の培養が不要で、迅速、簡便にビフィドバクテリウム属細菌菌種の同定・検出を行うことができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 1～21 から選ばれる塩基配列又は該塩基配列に相補的な配列を有するビフィドバクテリウム属細菌用プライマー。

【請求項 2】 請求項 1 記載のプライマーの 1 又は 2 以上を使用することを特徴とするビフィドバクテリウム属細菌菌種の同定方法。

【請求項 3】 (1) 検体中の DNA を抽出する工程、
(2) 請求項 1 記載のプライマーの 1 又は 2 以上を用いて PCR 反応を行う工程及び (3) 工程 (2) により増幅された DNA 断片を検出する工程を含むビフィドバクテリウム属細菌の菌種特異的検出方法。

【請求項 4】 (1) 検体中の DNA を抽出する工程、
(2) 請求項 1 記載のプライマーの 1 又は 2 以上を用いて PCR 反応を行う工程及び (3) 工程 (2) により増幅された DNA 断片を検出する工程を含むビフィドバクテリウム属細菌の菌種特異的定量方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ビフィドバクテリウム属細菌菌種の同定に有用な DNA プライマー及びこれを用いるビフィドバクテリウム属細菌菌種の同定・解析方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】ヒトや動物等の腸内細菌叢を同定・解析することは、個体の健康状態の把握、腸管内の病理的研究等に非常に有用である。特にビフィドバクテリウム属細菌は、グラム陽性の多型性桿菌でヒト腸内フローラにおける最優勢菌群のひとつであり、この菌種は、宿主に対して腸管感染防御作用、免疫機能の増強作用、栄養、腸内腐敗の抑制作用などの生理作用を持っており、この菌種分布を把握することは重要である。現状ではその手段として、種々の選択培地を組み合わせて用いる選別方法や顕微鏡観察が主に行われている。

【0003】菌種の同定、腸内細菌叢の解析を行うためには、対象となる個体の糞便を嫌気条件下において希釈液で希釈し、これを培地上にまき、嫌気性培養を行う必要がある。しかし、培養の際には数日から数週間の時間を要することとなり、コロニー数のカウント等操作も煩雑であった。

【0004】また、ヒトや動物の腸内に生息しているビフィドバクテリウム属細菌菌種の同定は、主に表現形質、すなわち、糖分解性状、発酵生産物（乳酸又は酢酸等）、一般生物学的性状等を検査することにより行われている。また、DNA-DNA ホモロジーによる判定も行われている (INTERNATIONAL JOURNAL of SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, vol. 21, No. 4, p. 276~294 (1971))。

【0005】しかしながら、表現形質を基にした同定法は、操作が煩雑であり、試験者の熟練を要する。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】このように、ビフィドバクテリウム属細菌菌種の同定・解析を行うには、長期間を要し、また操作が煩雑である等の問題があった。従って、本発明の目的は、ビフィドバクテリウム属細菌菌種を迅速、簡便に同定・解析し得る方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】斯かる現状に鑑み本発明者は鋭意研究を行ったところ、ビフィドバクテリウム属細菌の菌種に特異的な塩基配列を有する DNA プライマーを見出し、これを用いれば、細菌の培養を行うことなく、検体から抽出した細菌由来の DNA の PCR 反応により、迅速かつ簡便にビフィドバクテリウム属細菌の菌種の同定・解析が可能となることを見出し本発明を完成した。

【0008】すなわち本発明は、配列番号 1～21 から選ばれる塩基配列又は該塩基配列に相補的な配列を有するビフィドバクテリウム属細菌用プライマーを提供するものである。

【0009】また本発明は、該プライマーの 1 又は 2 以上を使用することを特徴とするビフィドバクテリウム属細菌菌種の同定方法を提供するものである。

【0010】更に本発明は、(1) 検体中の DNA を抽出する工程、(2) 上記プライマーの 1 又は 2 以上を用いて PCR 反応を行う工程及び (3) 工程 (2) により増幅された DNA 断片を検出する工程を含むビフィドバクテリウム属細菌の菌種特異的検出方法を提供するものである。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明のプライマーのターゲットには、系統分類の指標として信頼性の高い 16S rRNA 遺伝子を用いた。

【0012】プライマーは、本発明者がシーケンシングを行って得た塩基配列とデータベース (DDBJ, Genbank 等) や本発明者が比較対象として新たにシーケンスを行って得た塩基配列とを比較・検討することにより得たものである。ここで本発明者が比較対象として新たに 16S rRNA 遺伝子のシーケンスを行った菌種 (基準株) は、具体的には、ビフィドバクテリウム・ア

ングラータム (*Bifidobacterium angulatum*) ATCC 27535 株、ビフィドバクテリウム・アニマリス (*Bifidobacterium animalis*) ATCC 25527 株、ビフィドバクテリウム・ボウム (*Bifidobacterium boum*) ICM 1211 株、ビフィドバクテリウム・チョエリナム (*Bifidobacterium choerinum*) ATCC 27686 株、ビフィドバクテリウム・デンティウム (*Bifidobacterium dentium*) ATCC 27534 株、ビフィドバクテリウム・ガリカム (*Bifidobacterium gallicum*) ICM 8224 株、ビフィドバクテリウム・ガリナラム (*Bifidobacterium gallinarum*) ICM 6291 株、ビフィドバクテリウ

ム・インディカム(*Bifidobacterium indicum*) ICM1302株、ビフィドバクテリウム・インファンティス(*Bifidobacterium infantis*) ATCC15697株、ビフィドバクテリウム・マグナム(*Bifidobacterium magnum*) ICM1218株、ビフィドバクテリウム・メリシカム(*Bifidobacterium merycicum*) ISM8219株、ビフィドバクテリウム・シュードカタヌラータム(*Bifidobacterium pseudocatenulatum*) ICM1200株、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム サブスピーシーズ・グロボッサム(*Bifidobacterium pseudolongum ss. globosum*) ICM5820株、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム サブスピーシーズ・シュードロンガム(*Bifidobacterium pseudolongum ss. pseudolongum*) ICM1205株、ビフィドバクテリウム・プロラム(*Bifidobacterium pullorum*) ICM1214株、ビフィドバクテリウム・ルミナンティウム(*Bifidobacterium ruminantium*) ICM8222株、ビフィドバクテリウム・サエクラレ(*Bifidobacterium saeculare*) DSM6531株、ビフィドバクテリウム・ズブティル(*Bifidobacterium subtile*) DSM20096株、ビフィドバクテリウム・デンティコレンス(*Bifidobacterium denticolens*) DSM10105株、ビフィドバクテリウム・イノピオナータム(*Bifidobacterium inopionatum*) DSM10107株、ビフィドバクテリウム・カタヌラータム (*Bifidobacterium catenulatum*) ATCC27539株であり、これらの配列は、遺伝研データベースDDBJに登録した。

【0013】ビフィドバクテリウム属の菌種間でアライメントを行った。その結果、全部で9ヶ所ある可変領域のうちV2エリアとV3エリアに、多くの菌種に特異的な配列があることがわかった(図1)。また、ビフィドバクテリウム・ロンガム及びビフィドバクテリウム・インファンティスはV6エリアに、ビフィドバクテリウム・カタヌラータム及びビフィドバクテリウム・シュードカタヌラータムはV1エリアとV6エリアに両者を区別できる配列があることがわかった(図2)。そこで上記領域をターゲットとしてPCRプライマーを設計した。また、オリゴヌクレオチドの長さは、17~21b.pであり、これらは操作上最も好適な長さである。しかし、使用に際しては、各々の16SrRNA遺伝子中において、該オリゴヌクレオチドに隣接する数~数十b.pの塩基配列を増減させたものを用いても良い。

【0014】このようにして得られたプライマーのうち、配列番号1及び2記載の塩基配列を有するものは、ビフィドバクテリウム・アドレスセンチス(*Bifidobacterium adolescentis*)に特異的なDNAプライマーである。

【0015】また、配列番号3及び4記載の塩基配列を有するものは、ビフィドバクテリウム・ビフィダム(*Bifidobacterium bifidum*)に特異的なDNAプライマーで

ある。

【0016】また、配列番号5及び6記載の塩基配列を有するものはビフィドバクテリウム・ブレーベ(*Bifidobacterium breve*)に特異的なDNAプライマーである。

【0017】また、配列番号7及び8記載の塩基配列を有するものは、ビフィドバクテリウム・ロンガム(*Bifidobacterium longum*)に特異的なDNAプライマーである。

【0018】また、配列番号9及び10記載の塩基配列を有するものは、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム(*Bifidobacterium pseudolongum*)に特異的なDNAプライマーである。

【0019】また、配列番号11及び12記載の塩基配列を有するものは、ビフィドバクテリウム・アングラータム(*Bifidobacterium angulatum*)に特異的なDNAプライマーである。

【0020】配列番号13及び14記載の塩基配列を有するものは、ビフィドバクテリウム・カタヌラータム(*Bifidobacterium catenulatum*)に特異的なDNAプライマーである。

【0021】また、配列番号15及び16記載の塩基配列を有するものは、ビフィドバクテリウム・シュードカタヌラータム(*Bifidobacterium pseudocatenulatum*)に特異的なDNAプライマーである。

【0022】また、配列番号17及び18記載の塩基配列を有するものは、ビフィドバクテリウム・ガリカム(*Bifidobacterium gallicum*)に特異的なDNAプライマーである。

【0023】更に、配列番号7及び19記載の塩基配列を有するものは、ビフィドバクテリウム・インファンティス(*Bifidobacterium infantis*)に特異的なDNAプライマーである。

【0024】また、配列番号7及び21に記載のプライマーは、B. ロンガムのみならずB. インファンティス、B. ズイスの16SrRNA遺伝子ともバンドを形成した。しかし、これら3菌種は系統的に非常に近縁の種であり、細胞壁のペプチド鎖、ムレイン(酸)が同一であること、また、DNA-DNAホモロジーも70%前後であり、また前述のようにB. ロンガムグループが認識できるので、ビフィドバクテリウム属細菌菌種の同定において特に支障なく使用することができる。

【0025】更に、配列番号14及び20に記載のプライマーは、B. カタヌラータム及びB. シュードカタヌラータムの16SrRNA遺伝子ともバンドを形成した。しかし、これら2菌種についても同様の理由からB. カタヌラータムグループと認識できるので、同様に支障なく使用できる。

【0026】上記のように設計したオリゴヌクレオチドプライマーは、その塩基配列に従い、DNA合成機により、人工的に合成される。その種特異性は、ビフィドバ

クテリム属細菌と代表的な腸内細菌の16S rRNAに対するプライマーのバンド形成能を指標として確認した。結果として、上記のうち、B. アドレセンティス、B. ピフィダム、B. プレーベ、B. シュードロンガム、B. カテヌラータム、B. アングラータム、B. シュードカテヌラータム、B. ガリカム、B. インファンティスに対するプライマーの特異性に問題はなかった。一方、B. ロンガムに対するプライマーは、B. ズイスの16S rRNA遺伝子ともバンドを形成した。しかし、これら2菌種は系統的に非常に近縁の種であり、またDNA-DNAホモロジーも75~78%であり、また16S rRNA配列の類似性も99.7%を超えることから同一菌種に再分類されるべきで、両者を区別できなくても特に支障がないと考えられる。

【0027】本発明のプライマーは、このように特異性を有するため、これらを用いたビフィドバクテリウム属細菌用選択培地TOS、MPN上に形成されたコロニーから直接、あるいは培養した菌体からDNAを抽出し、各プライマーとの反応性を調べることによって菌種の簡易同定を行うことができる。また、本発明のプライマーを用いれば、培養を行うことなく、各固体の菌種レベルでの分布の調査が可能である。このような方法としては例えば次の方法が挙げられる。

【0028】まず、糞便等からDNAを抽出し、PCRのサンプルとする。糞便等の希釈液からDNAを抽出する方法としては、定法であるMarmur法、その変法である酵素法、及びベンジルクロライド法が好ましい。これらの方法は多少煩雑になるものの、酵素法において、幅広い菌種から収率よくDNAを抽出できる。また、純粋培養した細菌等から抽出したDNAに対しては、前述の方法の他、フェノール法等も好適に使用しうる。また、菌体の一部をバッファー又は滅菌水に懸たくし、95℃、15分程度加熱したものを、テンプレートとして、PCRに供することも可能である。

【0029】抽出されたDNAに種特異的プライマーを組み合わせ、増幅反応を行うことにより、種特異的なDNA配列(PCR産物)を得ることができる。通常、PCR法等にプライマーを使用する際には、2種類のプライマーを1組として用いることが好ましい。例えば、配列番号1及び2に係るプライマーを用いれば、多種類存在する細菌群のうち、ビフィドバクテリウム・アドレセンティスのDNAにおいてのみ、両者のプライマー間で増幅反応が起こり、これを同定することができる。このように2種類のプライマーを組にして用いる場合は、両者がリーディング鎖とラギング鎖との組み合わせになるようにする必要がある。また、PCR反応を行う際、ア

ニリングの温度はほぼ一定に設定してあるので、5種類のプライマーを同時に検定することも可能である。また、PCRを行う際に、予め鋳型のDNA量を段階希釈し、検出限界を求め同様の解析を行えば、目的とする菌種の定量化も可能である。

【0030】このようにして得られたDNAを電気泳動すれば、バンドの有無と用いたプライマーから菌種を同定することができる。

【0031】また、本発明のプライマーは、菌種特異的な配列を有しているため、単独でもプローブとして使用できる。更に、本発明のプライマー単独もしくは複数と他の公知のユニバーサルプライマーやオリゴヌクレオチドとを組み合わせても用いることができる。

【0032】また、本発明のプライマーを用いれば、ヒト、動物等の腸内等の解析も行える。現状では、ビフィドバクテリウム属細菌の菌種以外を検出することは不可能であるものの、ビフィドバクテリウム属細菌の分布、菌数が分かれば、健康状態等様々な情報が得られる。更に、その他の多岐にわたる細菌のプライマーと組み合わせ用いれば、細菌叢の全体像を把握することも可能である。

【0033】

【発明の効果】本発明のプライマーを使用すれば、菌を培養することなく、迅速、簡便、低コスト且つ高精度にビフィドバクテリウム属細菌菌種の同定を行うことができる。また、他の菌種特異的なプライマー等と組み合わせ使用することで、腸内細菌叢の解析等をも行うことができる。更に、解析の結果から消化管等の状態が把握できるため、種々疾病等の予防・治療が容易になる。

【0034】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0035】実施例1 プライマーの設計及び合成：DDBJ、Genbank等のデータベースより得られたビフィドバクテリウム属細菌の16S rRNA遺伝子配列と、本発明者らが解読した上記の16S rRNA遺伝子配列を基に、種特異的なプライマーの設計を行った。可変領域のうちV1、V2、V3、V6エリアに菌種特異的な配列が認められたので、これをターゲットとしてプライマーを作成した。プライマーの二本鎖形成能は、塩基配列中のGC含量と塩基数に依存するため、GC含量に伴って塩基数に差異が生じた。こうして設計した塩基配列に従い、DNA合成機を用いてプライマーを合成した。

【0036】

【表1】

配列	配列番号	長さ	ターゲット サイト	プロダクト サイズ	目的微生物
BiADO-1 CTCCAGTTGGATGCATGTC	1	19	182-200	279	<i>B. adolescentis</i>
BiADO-2 CGAAGGCTTGCTCCCACT	2	18	476-442		
BiANG-1 CAGTCCATCGCATGGTGGT	11	19	185-203	275	<i>B. angulatum</i>
BiANG-2 GAAGGCTTGCTCCCAAC	12	18	476-441		
BiBIF-1 CCACATGATCGCATGTGATTG	3	21	184-203	278	<i>B. bifidum</i>
BiBIF-2 CCGAAGGCTTGCTCCCAAA	4	19	478-442		
BiBRE-1 CCGGATGCTCCATCACAC	5	18	175-192	288	<i>B. breve</i>
BiBRE-2 ACAAAGTGCTTGCTCCCT	6	19	477-444		
BiCAT GATCCGGGAGTTTGCTGCC	13	19	70-91		<i>B. catemulatum</i>
BiCATg-2 CGAAGGCTTGCTCCCGAT	14	18	1125-1006		
BiPSC-1 ATCCATCAGGCTTTGCTTGG	15	20	71-91	939	<i>B. pseudocatemulatum</i>
BiPSC-2 GAGGCCATATCTCTACGGCT	16	20	1026-1006		
BiGAL-1 TAATACCGGATGTTCCGCTC	17	20	170-189	303	<i>B. gallicum</i>
BiGAL-2 ACATCCCGAAAGGACGC	18	18	484-454		
BiLONg TTCCAGTTGATCGCATGGTC	7	20	182-201	831	<i>B. longum</i>
BiLON-1 GGGAAGCCGTATCTCTACGA	8	20	1028-1009		
BiLONg TTCCAGTTGATCGCATGGTC	7	20	182-201	828	<i>B. infantis</i>
BiINF-1 GGAAACCCCATCTCTGGGAT	19	20	1027-1008		
BiPDL-1 CACATGAGCGCATGCGAG	9	18	185-202	297	<i>B. pseudolongum</i>
BiPDL-2 TCCACTCAACACGGCCGAA	10	19	468-486		
BiCATg-1 CCGATGCTCCGACTCCT	20	17	176-192	289	<i>B. catemulatum</i> (<i>B. pseudocatemulatum</i>)
BiCATg-2 CGAAGGCTTGCTCCCGAT	14	18	1125-1006		
BiLONg TTCCAGTTGATCGCATGGTC	7	20	182-201	277	<i>B. longum</i> (<i>B. infantis</i> , <i>B. suis</i>)
BiLON-2 TCSCGCTTGCTCCCGAT	21	18	478-441		

【0037】実施例2 プライマーを用いた菌種の同定及び菌種特異性の確認：本発明のプライマーが、実際に種特異性を有しているかを確認するため、以下の実験を行った。

(1) 菌株の純粋培養及びDNAの抽出

表2及び3に示す、31菌種47株のビフィドバクテリウム属細菌と、9属15菌種の代表的腸内細菌とをGAM broth 培地（ニッスイ社製）に一晩純粋培養した。このとき、嫌気性細菌は嫌気的に好気性細菌は好気的に培養した。こうして得た菌体62種類各々から、ガラスビーズを用いたフェノール法により、DNAを抽出した。

【0038】(2) PCR反応

総量を25 μ lとし、50mM Tris-HCl (pH 8.8), 15mM (NH₄)₂SO₄, 25mM MgCl₂, 0.45% Triton X-100, 200 μ M dNTP mixture 200mg/ml BSA に、各々0.25 μ Mプライマー、0.9U Taq DNAポリメラーゼ (Biotech Internat

ional), 10ngテンプレートDNAを含む反応液で、Hybaid Touchdown Terminal Cycler (Lab systems Japan) により、94 $^{\circ}$ C 5分の熱変性の後94 $^{\circ}$ C 20秒、55 $^{\circ}$ C 20秒、72 $^{\circ}$ C 30秒を30サイクルのPCR反応を行った。この条件で、(1)のサンプル62種類と本発明のプライマーとを反応させた。

【0039】(3) プライマーの種特異性の検討

(2)で得られたPCR産物を電気泳動し、バンドの有無により、プライマーの特異性を判定した。1%LO.3Ag arose(タカラ社製)で、ミュービットにより100V、25分電気泳動し、ethidium Bromideで染色後、UVランプ下でバンドの有無を観察した。その結果は表2、3に示す通り、プライマーはビフィドバクテリウム属細菌特異的にバンドを形成した。具体的には、ターゲットとする*B. adolescentis* 4株からは目的とするPCR産物が得られたが、他の*Bifidobacterium* 及び腸内菌からは目的とするサイズのPCR産物が得られず、この特異的プライマーBiADO により*B. adolescen*

tis の特異的な検出が可能であることがわかった。同様に、他のBifidobacterium 菌種特異的プライマーの特異性を調べたところ、BiBIF、BiBRE、BiANG、BiPDLは、それぞれ*B. bifidum*、*B. breve*、*B. angulatum*、*B. pseudolongum*を特異的に検出できることがわかった。

【0040】一方、BiLONgは*B. longum*以外にも*B. infantis*、*B. suis*のDNAを鋳型としてもPCR産物が生じた。しかし、この三者は系統的に非常に近縁な種であり、DNA-DNA相同性も70%前後であることから今後同一菌種に再分類される可能性が高い。したがってこれら3菌種は*B. longum*グループとしても認識でき、表現性状も似ていることから、これら*

*を明確に区別できなくても特に支障はないと考えられる。BiCATgも*B. catenulatum*以外に*B. shudder*カテヌラタムのDNAを鋳型としてもPCR産物が生じることがわかった。しかし、この場合も両者は系統的に非常に近縁な種であり、今後同一菌種に再分類される可能性が高い。したがって、これらを明確に区別できなくても特に支障はないと考えられる。

【0041】また、同様にBiPSC、BiGAL、BiLON、BiINFについても試験した。結果を表4～6に示す。

【0042】

【表2】

List of bacterial strains and the results of PCR assays using species-specific primer, BiADO, BiANG, BiBIF, BiBRE, BiCATg, and BiLONg

Species	Strain ^a	Species-specific primers							
		BiADO	BiANG	BiBIF	BiBRE	BiCATg	BiLONg	BiPDL	BiCAT
<i>B. adolescentis</i>	ATCC 15703 ^T	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. adolescentis</i>	NCFB 2229	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. adolescentis</i>	NCFB 2230	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. adolescentis</i>	NCFB 2231	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. angulatum</i>	ATCC 27535 ^T	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>B. angulatum</i>	JCM 1252	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i>	ATCC 29521 ^T	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i>	ATCC 15696	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i>	ATCC 11863	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i>	FERM BP-791	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>B. breve</i>	ATCC 15700 ^T	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. breve</i>	ATCC 15698	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. breve</i>	FERM P-15488	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. catenulatum</i>	ATCC 27539 ^T	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>B. catenulatum</i>	JCM 7130	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>B. pseudocatenulatum</i>	JCM 1200 ^T	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>B. pseudocatenulatum</i>	DSM 20439	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>B. gallicum</i>	JCM 8224 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	ATCC 15707 ^T	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>B. longum</i>	ATCC 15708	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>B. longum</i>	FERM P-6548	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>B. infantis</i>	ATCC 15697 ^T	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>B. infantis</i>	ATCC 15702	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>B. infantis</i>	ATCC 25862	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>B. suis</i>	ATCC 27533 ^T	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>B. animalis</i>	ATCC 25527 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. asteroides</i>	ATCC 25910 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.baum</i>	JCM 1211 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.choerimon</i>	ATCC 27686 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.coryneforme</i>	ATCC 25911 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.auriculi</i>	ATCC 27916 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.denticolens</i>	DSM 10105 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.dentrinum</i>	ATCC 27534 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.gallinarum</i>	JCM 6291 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.indicum</i>	ATCC 25912 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.inopinatum</i>	DSM 10107 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.lactis</i>	DSM 10140 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.magnum</i>	JCM 1218 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.merycium</i>	JCM 8219 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.minimum</i>	ATCC 27538 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.globosum^b</i>	ATCC 25864 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.pseudolongum^b</i>	JCM 1205 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.pullorum</i>	JCM 1214 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.novinantium</i>	JCM 8222 ^T	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.saeculare</i>	DSM 6531 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-

Species	Strain ^a	Species-specific primers							
		BiADO	BiANG	BiBIF	BiBRE	BiCAT ₂	BiLON ₂	BiPDL	BiCAT
<i>B. subtilis</i>	DSM 20096 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. thermophilum</i>	ATCC 25866 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. ps' longum</i> SS. <i>ps' longum</i>	JCM 1205	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>B. ps' longum</i> SS. <i>giobosum</i>	ATCC 25864 ^T	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>E. coli</i>	ATCC 11775 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	NCTC 9343 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacteroides ovatus</i>	JCM 5824 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacteroides vulgatus</i>	ATCC 8424 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium bifementans</i>	JCM 1386 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	JCM 1290 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 19434 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	ATCC 25986 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eubacterium bifforme</i>	ATCC 27806 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gardnerella vaginalis</i>	DSM 4944 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	ATCC 6919 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Peptostreptococcus prevorii</i>	ATCC 9321 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ruminococcus productus</i>	ATCC 27340 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-

【 0 0 4 4 】

【 表 4 】

List of bacterial strains and the results of PCR assays using species-specific primer, BiCAT, BiPSC, BiLON, and BiINF

Species	Strain ^a	Species-specific primers			
		BiPSC	BiGAL	BiLON	BiINF
<i>B. adolescentis</i>	ATCC 15703 ^T	-	-	-	-
<i>B. adolescentis</i>	NCFB 2229	-	-	-	-
<i>B. adolescentis</i>	NCFB 2230	-	-	-	-
<i>B. adolescentis</i>	NCFB 2231	-	-	-	-
<i>B. angulatum</i>	ATCC 27535 ^T	-	-	-	-
<i>B. angulatum</i>	JCM 1252	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i>	ATCC 29521 ^T	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i>	ATCC 15696	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i>	ATCC 11863	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i>	FERM BP-791	-	-	-	-
<i>B. breve</i>	ATCC 15700 ^T	-	-	-	-
<i>B. breve</i>	ATCC 15698	-	-	-	-
<i>B. breve</i>	FERM P-15488	-	-	-	-
<i>B. catenulatum</i>	ATCC 27539 ^T	-	-	-	-
<i>B. catenulatum</i>	JCM 7130	-	-	-	-
<i>B. pseudocatenulatum</i>	JCM 1200 ^T	+	-	-	-
<i>B. pseudocatenulatum</i>	DSM 20439	+	-	-	-
<i>B. gallicum</i>	JCM 8224 ^T	-	+	-	-
<i>B. longum</i>	ATCC 15707 ^T	-	-	+	-
<i>B. longum</i>	ATCC 15708	-	-	+	-
<i>B. longum</i>	FERM P-6548	-	-	+	-
<i>B. infantis</i>	ATCC 15697 ^T	-	-	-	+
<i>B. infantis</i>	ATCC 15702	-	-	-	+
<i>B. infantis</i>	ATCC 25962	-	-	-	+
<i>B. suis</i>	ATCC 27533 ^T	-	-	+	-
<i>B. animalis</i>	ATCC 25527 ^T	-	-	-	-
<i>B. asteroides</i>	ATCC 25910 ^T	-	-	-	-
<i>B. boum</i>	JCM 1211 ^T	-	-	-	-
<i>B. choerinum</i>	ATCC 27686 ^T	-	-	-	-
<i>B. coryneforme</i>	ATCC 25911 ^T	-	-	-	-
<i>B. cummuli</i>	ATCC 27916 ^T	-	-	-	-
<i>B. denticolens</i>	DSM 10105 ^T	-	-	-	-
<i>B. denrrium</i>	ATCC 27534 ^T	-	-	-	-
<i>B. gallinarum</i>	JCM 6291 ^T	-	-	-	-
<i>B. indicum</i>	ATCC 25912 ^T	-	-	-	-
<i>B. inopinatum</i>	DSM 10107 ^T	-	-	-	-
<i>B. lactis</i>	DSM 10140 ^T	-	-	-	-
<i>B. magnum</i>	JCM 1218 ^T	-	-	-	-
<i>B. merycium</i>	JCM 8219 ^T	-	-	-	-
<i>B. minimum</i>	ATCC 27538 ^T	-	-	-	-
<i>B. globosum^b</i>	ATCC 25864 ^T	-	-	-	-
<i>B. pseudolongum^b</i>	JCM 1205 ^T	-	-	-	-
<i>B. pullorum</i>	JCM 1214 ^T	-	-	-	-

Species	Strain ^a	Species-specific primers			
		BiPSC	BiGAL	BiLON	BiINF
<i>B. ruminantium</i>	JCM 8222 ^T	—	—	—	—
<i>B. saeculare</i>	DSM 6531 ^T	—	—	—	—
<i>B. subtilis</i>	DSM 20096 ^T	—	—	—	—
<i>B. thermophilum</i>	ATCC 25866 ^T	—	—	—	—
<i>E. coli</i>	ATCC 11775 ^T	—	—	—	—
<i>Bacteroides fragilis</i>	NCTC 9343 ^T	—	—	—	—
<i>Bacteroides ovatus</i>	JCM 5824 ^T	—	—	—	—
<i>Bacteroides vulgatus</i>	ATCC 8424 ^T	—	—	—	—
<i>Clostridium bifermentans</i>	JCM 1386 ^T	—	—	—	—
<i>Clostridium perfringens</i>	JCM 1290 ^T	—	—	—	—
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433 ^T	—	—	—	—
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 19434 ^T	—	—	—	—
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	ATCC 25986 ^T	—	—	—	—
<i>Eubacterium biforme</i>	ATCC 27806 ^T	—	—	—	—
<i>Gardnerella vaginalis</i>	DSM 4944 ^T	—	—	—	—
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356 ^T	—	—	—	—
<i>Propionibacterium acnes</i>	ATCC 6919 ^T	—	—	—	—
<i>Peptostreptococcus prevorii</i>	ATCC 9321 ^T	—	—	—	—
<i>Ruminococcus productus</i>	ATCC 27340 ^T	—	—	—	—

【0046】

* * 【表6】

Species	Strain ^a	Species-specific primers			
		BiPSC	BiGAL	BiLON	BiINF
<i>E. coli</i>	ATCC 11775 ^T	—	—	—	—
<i>Bacteroides fragilis</i>	NCTC 9343 ^T	—	—	—	—
<i>Bacteroides ovatus</i>	JCM 5824 ^T	—	—	—	—
<i>Bacteroides vulgatus</i>	ATCC 8424 ^T	—	—	—	—
<i>Clostridium bifermentans</i>	JCM 1386 ^T	—	—	—	—
<i>Clostridium perfringens</i>	JCM 1290 ^T	—	—	—	—
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433 ^T	—	—	—	—
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 19434 ^T	—	—	—	—
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	ATCC 25986 ^T	—	—	—	—
<i>Eubacterium biforme</i>	ATCC 27806 ^T	—	—	—	—
<i>Gardnerella vaginalis</i>	DSM 4944	—	—	—	—
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356 ^T	—	—	—	—
<i>Propionibacterium acnes</i>	ATCC 6919 ^T	—	—	—	—
<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	ATCC 9321 ^T	—	—	—	—
<i>Ruminococcus productus</i>	ATCC 27340 ^T	—	—	—	—

【0047】実施例3 プライマーを用いたヒト腸内細菌叢の菌種同定及び解析：

(1) 糞便のサンプリング

ヒト大便サンプルから直接抽出したDNAを鋳型にPCR反応を行うことで、培養を行うことなくビフィドバクテリウム属細菌を菌種レベルで検出することを試みた。サンプルとしては、健康な成人男性8名の糞便を採取したものを用いた。成人男性は4名ずつミルミル（当社実施品：1本あたり平均で*Lactobacillus acidophilus*を2×10⁹、*Bifidobacterium bifidum*を10⁹、*Bifidobacterium breve*を10¹⁰含有）投与群と非投与群とに分け、サンプリング前後の発酵乳投与の有無による腸内細菌

叢への影響も併せて検討した。すなわち、両群への発酵乳等生菌含有食品投与を4週間止めた後、4名にはミルミルを1日3本食後飲用させ、他の4名には、細菌が含まれておらず他の成分の組成は同一の偽ミルミルを同量飲用させた。飲用開始4週間後、糞便を採取して、TE buffer にて洗浄し、50mgずつ分割して-80℃で保存した。

【0048】(2) DNAの抽出

酵素法を用いて、DNAの抽出を行った。サンプルを500μlの50mM Tris-HCl (pH 8.0) - 10mM EDTA - 10mM NaClに浮遊し、凍結と融解を2回繰り返した。その後100μlの10m

g/ml アクロモペプチダーゼ溶液と7.5 μ lの50 mg/ml リゾチーム溶液、25 μ lの0.5 mg/ml N-アセチルムラミダーゼ溶液を加え、37℃で60分反応した。更に、20% SDS溶液 (final 1.5%) と4 μ lの10 mg/ μ l プロテイナーゼK溶液を加え、37℃で60分反応させた。フェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール処理を行った。次に1/20倍容のRNase A溶液 (1 mg/ml) を加えて37℃で60分反応し、フェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール処理後、エタノール沈殿した。沈殿を400 μ l TE buffer に溶かして、限外濾過チューブC3 LTK (Millipore) により精製した。また、紫外線領域の吸光度を測定してDNAの収量を求めた。

【0049】(3) PCR反応

実施例2(2)と同様の条件で、(1)のサンプルと各プライマーとを反応させた。

*

volunteers	BiADO	BiANG	BiBIF	BiBRE	BiCATg	BiLONG
Adult-1	+	-	+	-	+	+
Adult-2	-	-	-	-	+	+
Adult-3	+	-	-	-	+	+
Adult-4	-	-	+	-	+	+
Adult-5*	+	-	+	+	+	+
Adult-6*	+	-	+	+	+	+
Adult-7*	+	-	+	+	+	+
Adult-8*	+	-	+	+	+	+

10ng of DNA were used for the analysis

*:volunteers who drunk "MIL MIL"

+:positive

-:negative

【0052】実施例4 プライマーを用いた野性株の菌種同定：まず、ビフィドバクテリウム属野性株の菌種同定を、作成したプライマーにより試みた。表8の各株からDNAを抽出し、これを鋳型としてPCR反応を行って、どのプライマーを使用したときに増幅産物が得られるかを調べた。

【0053】一方、従来の方法として、最も高精度な同定方法であるDNA-DNA相同性試験も行ったところ本発明のプライマーによる結果とこの結果は一致してい

*【0050】(4) PCR産物の確認

電気泳動により、PCR産物の確認を行ったところ、ミルミル投与群では、全ての検体で投与菌と同じ菌種のビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・プレーベが検出された。非投与群においては、ビフィドバクテリウム・ビフィダムが4名中2名、ビフィドバクテリウム・プレーベが4名中1名から検出された。これらの菌が、元々腸内に常在していた菌であるのか投与された菌であるのかは確認できなかった。一方、ビフィドバクテリウム・カテネラータム、ビフィドバクテリウム・ロンガムは8名全てから検出され、ビフィドバクテリウム・アドレセンティスも8名中7名から検出されたことから、これらはヒト成人に広く分布しているものと推測される。結果は表7に示す。

【0051】

【表7】

た(表8)。また、(21. Scardovi, V.1984. Genus Bifidobacterium Orla-Jensen, 1924, 472, p1418-1434. In N.R.Krieg and J.G.Holt(ed), Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1. The William & Wilkins Co., Baltimore.)でも菌種同定を行ったところ、本発明のプライマーによる結果とほぼ同様の結果が得られた(表8)。

【0054】

【表8】

Identification of isolated strains of *Bifidobacterium* through the use of species- and group-specific primers

Strains	species-specific primers									
	BIADO	BIANG	BIIBIF	BIERE	BIPSC	BILON	BiINF	Phenotypic traits	DNA-DNA homology	
MC-36, 37, 38, 39, 40, 41	+	-	-	-	-	-	-	<i>B. adolescentis</i> or similar species	<i>B. adolescentis</i>	
MC-1, 2, 3, 4, 31, 32, 33	-	-	+	-	-	-	-	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>	
MC-5, 6, 14, 15, 16, 18, 20, 21, 22	-	-	-	+	-	-	-	<i>B. breve</i>	<i>B. breve</i>	
MC-42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49	-	-	-	-	+	-	-	<i>B. adolescentis</i> or similar species	<i>B. pseudocatenulatum</i>	
MC-10, 11, 12, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. longum</i>	<i>B. longum</i>	
MC-8, 9	-	-	-	-	-	-	+	<i>B. infantis</i>	<i>B. infantis</i>	

【0055】DNA-DNA相同性試験においてB. カ
テヌラータムとB. シュードカテヌラータム、B. ロン
ガムとB. インファンティスは、近縁種どうしであるた
め、お互い高いホモロジーを示したが、一方が20%程
度もう一方よりも高いことから判別可能であった。

【0056】実施例5

成人のビフィドバクテリウム菌種分布の解析

合計で成人33検体の糞便から抽出したDNAを鋳型と
して各菌種特異的プライマーを用いてPCR増幅を行
い、それぞれの個体のビフィドバクテリウムの菌種構成
を調べた(表9)。このデータをもとに、それぞれの菌

種の分布状況(検出率)を求めたところ、これら6菌種
のうち最も広くヒト成人の腸管内に分布していたのは
B. ロンガムの70%で、ついでB. アドレセンスティ
ス58%、以下、B. シュードカテヌラータムの55
%、B. ビフィダム42%、B. プレーベ15%、B.
アングラータムが6%となっていて、B. インファンテ
イスとB. ガリカムは検出されなかった。

【0057】乳児のビフィドバクテリウム菌種分布の解
析

同様に生後1ヶ月の乳児27検体のビフィドバクテリウ
ムの菌種構成を調べ(表9)、それぞれの菌種の分布状

況（検出率）をもとめたところ、最も検出率の高かったのは、B. プレーベ70%で、以下B. インファンティスの41%、B. ロンガム37%、B. ビフィダム22%、B. カテヌラータム グループの19%、B. アドレセンスティス7.4%、B. アングラータム3.7%となっていた。

【0058】方法

成人サンプル

健康成人33名の糞便サンプルを用いた。被験者は我々の知る限りにおいて、腸疾患を持たず、サンプリング前の1週間は抗生物質の投与やヨーグルトなどの生菌の含まれる食品を摂取していない。

【0059】乳児サンプル

生後1ヶ月の健常な母乳栄養児27名について調べた。乳児は1997年に長崎大学附属病院で、通常分娩により生まれた。どの乳児も消化器系の異常はなく、また抗生物質の投与も受けていない。

【0060】糞便からのDNAの抽出

健常な成人から採取した糞便10mgをもちい、Zhuらのベンジルクロライド法に従ってDNAを抽出した。糞便中に多く含まれるPCRの阻害物質を除去する目的で、検体を1mlのTEに懸濁し、15000rpmで遠心分離後上清を捨てるという操作を3回繰り返した。このサンプルを250μlのExtraction Buffer (100mM Tris-HCl, 40mM EDTA, pH9.0) に浮遊し、50μlの10%SDSを加

えて凍結・融解を3回繰り返した。150μlのベンジルクロライドを加え、Micro Incubator M-36 (TAITECH, Tokyo, Japan) により50℃で30分激しく振とうした。反応後、3M

Sodium acetateを150μl添加し、氷中に15分間静置した。15000rpmで10分間遠心分離を行い、上清を別のチューブにとって等量のイソプロパノールを加え、析出したDNAを回収した。得られたDNAを100μlのTEに溶解し、1μlを鋳型DNAとして用いた。

【0061】PCRの条件

PCR反応は、総量を25μlとし、10mM Tris-HCl (pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、200μM dNTP混合物、各25μMプライマー、0.9U Taq DNAポリメラーゼ (Perkin Elmer)、1μlテンプレートDNAを含む反応液で、Touchdown Thermal Cycler (Hybaid) により行った。反応液は、テンプレートDNAの二本鎖の解離のため94℃で3分加熱した後、94℃20秒、55℃20秒、72℃30秒を35サイクルで行った。増幅産物は1%アガロースで電気泳動後、臭化エチジウムで染色してUV下でバンドの有無を観察した。

【0062】

【表9】

specimen	プライマー								
	BiADO	BiANG	BiBIF	BiBRE	BiCATg	BiPSC	BiLON	BiINF	BiCAL
AD-1	+	-	-	-	+	-	-	-	-
AD-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AD-3	+	-	-	-	+	-	w	-	-
AD-4	-	-	+	+	+	+	+	-	-
AD-5	+	-	-	-	+	-	-	-	-
AD-6	+	-	-	-	+	-	-	-	-
AD-7	-	-	-	-	+	w	w	-	-
AD-8	-	-	-	-	+	+	-	-	-
AD-9	+	-	+	-	+	+	+	-	-
AD-10	+	-	+	-	+	+	+	-	-
AD-11	+	-	+	-	+	-	w	-	-
AD-12	-	-	-	-	+	-	-	-	-
AD-13	+	-	-	-	+	+	+	-	-
AD-14	-	-	-	-	-	-	w	-	-
AD-15	-	-	-	-	+	-	+	-	-
AD-16	+	-	+	+	+	+	+	-	-
AD-17	-	-	+	-	+	-	+	-	-
AD-18	-	-	-	-	-	-	w	-	-
AD-19	-	-	-	-	+	+	+	-	-
AD-20	-	-	+	-	+	+	+	-	-
AD-21	+	-	+	-	+	-	+	-	-
AD-22	-	-	-	-	+	+	+	-	-
AD-23	+	-	-	-	+	+	+	-	-
AD-24	(+)	-	+	(+)	+	+	-	-	-
AD-25	+	-	+	-	+	w	w	-	-
AD-26	+	-	-	-	+	+	w	-	-
AD-27	+	-	+	-	+	-	+	-	-
AD-28	+	-	-	w	+	+	+	-	-
AD-29	+	-	-	-	-	-	-	-	-
AD-30	+	-	+	-	+	+	+	-	-
AD-31	-	-	+	+	+	+	+	-	-
AD-32	-	-	-	-	+	-	-	-	-
AD-33	+	-	+	-	w	w	-	-	-
No. of Detection	19	2	14	5	29	18	23	0	0
%Detection	58	6.0	42	15	88	55	70	0	0

【0063】

【表10】

No.	BiADO	BiANG	BiBIF	BiBRE	BiCATg	BiPSC	BiLON	BiINF
1	-	-	-	+	-	-	-	-
2	-	-	+	-	-	-	-	-
3	-	-	+	+	-	-	w	+
4	-	-	-	+	-	-	-	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	w	-	-	-	+
7	-	-	-	+	-	-	+	+
8	-	-	-	-	-	-	+	-
9	-	-	-	+	-	w	+	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	+	-	-	-	-
13	-	-	-	+	+	+	-	+
14	+	-	+	-	-	-	-	-
15	-	-	-	+	+	+	-	-
16	-	-	-	+	-	-	w	-
17	-	-	-	+	w	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	+	-	-	-	-
20	-	-	+	+	w	-	-	+
21	-	-	-	-	-	-	+	-
22	-	-	+	+	+	-	+	+
23	-	-	-	-	-	-	-	+
24	-	-	-	+	-	-	+	+
25	-	-	-	+	-	-	-	-
26	-	-	-	+	-	-	-	-
27	-	-	-	+	-	-	+	+
28	+	w	+	+	-	-	+	w
	2	1	6	19	5	2	10	11
	7.4	3.7	22	70	19	7.4	37	41

体数の比較定量:

(1) 検出可能な鋳型DNA濃度の検討

各プライマーが目的とする配列をPCR増幅するための鋳型DNA量の下限を検討したところ、100fg程度まで可能であった。そこで、糞便から抽出したDNAの量を変えて各プライマーによるPCR反応を行えば、各菌種の比較定量が可能であると考えられた。そこで、成人男性2名(Adult D及びAdult F)に実施例3と同様にミルミルを投与し、その糞便中、すなわち腸内細菌叢を解析するため、糞便より抽出した鋳型DNAを10ngから10fgまで10倍段階希釈し、菌株の比較定量化を図ることとした。

【0065】(2) 細菌群の比較定量化

まず、各濃度の鋳型DNAと本発明のプライマーとを実施例2と同様の条件にてPCR反応に供した後、バンド形成の有無により細菌叢中に存在する菌種を同定した。その結果、ビフィドバクテリウム属細菌菌種により、検出可能な鋳型DNA濃度が異なっていた(表11、表12)。このとき、検出可能な鋳型DNA濃度が低いプライマー程、そのプライマーに特異的な菌種の濃度が高いものと予想される。

【0066】

【表11】

Adult-D*

鋳型DNA	BiADO	BiANG	BiBIF	BiBRB	BiCATg	BiLONg
10ng	+	-	+	+	+	+
1ng	+	-	+	+	+	+
100pg	+	-	W	W	+	W
10pg	W	-	-	-	+	-
1pg	W	-	-	-	W	-
100fg	-	-	-	-	W	-
10fg	-	-	-	-	-	-

30

サンプルD-6

目的微生物	培地	Optimalcount	Dilution	Inoc.vol.	Log(N)/g	Na	%
総細菌数(嫌気性)	VLM	46	9	0.5	11.0	9.2E+10	100
<i>Bacteroides</i> sp.	VLM-B	17	9	0.5	10.5	3.4E+10	37
<i>Bifidobacterium</i> sp.	MPN	93	8	0.5	10.3	1.9E+10	20
<i>B. breve</i> FERM P-15488		23	5	0.05	7.7	4.6E+07	0
<i>B. Bifidum</i> 4007 FERM BP-791		32	5	0.05	7.8	6.4E+07	0

【0070】

* * 【表14】

サンプルF-6

目的微生物	培地	Optimalcount	Dilution	Inoc.vol.	Log(N)/g	Na	%
総細菌数(嫌気性)	VLM	53	9	0.5	11.0	1.1E+11	100
<i>Bacteroides</i> sp.	VLM-B	101	8	0.5	10.3	2E+10	19
<i>Bifidobacterium</i> sp.	MPN	137	8	0.5	10.4	2.7E+10	26
<i>B. breve</i> 4065 FERM P-15488		61	6	0.05	9.1	1.2E+09	1.2
<i>B. bifidum</i> FERM BP-791		198	6	0.05	9.6	4E+09	3.7

【0067】

【表12】

Adult-F*

鋳型DNA	BiADO	BiANG	BiBIF	BiBRB	BiCATg	BiLONg
10ng	+	-	+	+	+	+
1ng	+	-	+	+	+	+
100pg	+	-	+	+	+	+
10pg	+	-	+	W	+	W
1pg	-	-	W	W	+	W
100fg	-	-	-	-	-	-

【0068】また、一方ビフィドバクテリウム属細菌に特異的な選択培地であるMPN培地、バクテロイデス属細菌に特異的な選択培地であるVLM-B培地、及び各種細菌の増殖培地であるVLM培地にて、上記の糞便サンプルを10⁸倍希釈したものを培養し、培養後のコロニー数から総ビフィドバクテリウム属細菌数、総バクテロイデス属細菌数、総細菌数を算出した。また、これに合せてビフィドバクテリウム・プレーベ及びビフィドバクテリウム・ビフィダムの菌数も算出した。その結果、総ビフィドバクテリウム属細菌数はAdult Dで1.9×10⁸Adult Fで2.7×10¹⁰であり、ビフィドバクテリウム・プレーベ菌数が4.6×10⁷、ビフィドバクテリウム・ビフィダム菌数が6.4×10⁷であった。その他の各菌数は表13、表14に示す。

【0069】

【表13】

【0071】本発明のプライマーにより、最も低濃度で検出できたビフィドバクテリウム属細菌は、ビフィドバクテリウム・カテヌラータムグループであり、次に低濃度で検出できたビフィドバクテリウム・アドレセンティスよりも10倍低濃度であった。このため、ビフィドバクテリウム・カテヌラータムグループは最優勢の菌種であると考えられ、Adult Dでコロニー数から求めた総ビフィドバクテリウム属細菌数が 1.9×10^{10} であったことと合わせて、その菌数は 10^{10} オーダーと考えられた。また、ビフィドバクテリウム・プレーベ及びビフィドバクテリウム・ビフィダムは共に100pgで弱く検出されていた。これは弱く検出された濃度の約100分の1～1000分の1であったので、両者の菌数は $10^7 \sim 10^9$ オーダーと推察され、コロニー数から求めた値と合致していた。ビフィドバクテリウム・プレーベ及びビフィドバクテリウム・ビフィダムは成人にはあまり一般的な菌種でないため、上記において検出されたものはミルミル由来の株であると考えられる。

【0072】また、Adult Fにおいてもビフィドバクテリウム・カテヌラータムグループは最も低濃度で検出されており、最優勢の菌種であることが示唆された。また、B. プレーベ及びB. ビフィダムは1pgで弱く検出されており、Adult Dと比べて10～100倍の菌数が存在することが示唆され、コロニー数から算出した菌数と合致していた。このように、本発明のプライマーを用いた定量結果とコロニー数から算出した菌数は合致しており、本発明のプライマーを用いた定量方法の定量性が確認された。

【0073】

【配列表】

<110> 株式会社 ヤクルト本社；財団法人ヤクルト・バイオサイエンス研究財団 (KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA; ZAIHAN HOJIN YAKULT・BIO SCIENCE KENKYU ZAIHAN)

<120> ビフィドバクテリウム属細菌用プライマー

<130> P03561008

<150> JP 1997-219567

<151> 1997-8-14

<160> 19

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

ctccagttgg atgcatgtc 19

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

cgaaggcttg ctccagct 18

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

ccacatgatc gcatgtgatt g 21

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

ccgaaggctt gctcccaaa 19

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

ccgatgctc catcacac 18

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

acaaagtgcc ttgctccct 19

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

ttccagttag tcgcatggtc 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

gggaagccgt atctctacga 20

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

cacatgagcg catgagcg 18

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

tccactcaac acggccgaa 19

<210> 11

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 11
 cagtccatcg catggtggt 19
 <210> 12
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 12
 gaaggttgc tccccaac 18
 <210> 13
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 13
 gatccgggag ttgctgcc 19
 <210> 14
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 14
 cgaaggcttg ctcccgat 18
 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 15
 atccatcagg ctttgcttgg 20
 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 16
 gaggccatat ctctacggt 20

<210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 17
 taataaccgga tgttccgctc 20
 <210> 18
 <211> 18
 <212> DNA
 10 <213> Artificial Sequence
 <400> 18
 acatccccga aaggacgc 18
 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 19
 ggaaacccca tctctgggat 20
 <210> 20
 20 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 20
 cggatgctcc gactcct 17
 <210> 21
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 21
 30 tcscgcttgc tcccgat 18

【図面の簡単な説明】

【図1】 ビフィドバクテリウム属細菌の16S rRNA配列のうちV2及びV3エリアを比較した図

【図2】 ビフィドバクテリウム属細菌の16S rRNA配列のうちV6及びV1エリアを比較した図

【図 1】

A		161	227
<i>B. adolescentis</i>		AACGGGTGGTAATGCCGGATGCTCCAGTTGGATGCATGTCCTTCTGG-GAAAG	
<i>B. angulatum</i>		AACGGGTGGTAATGCCGGATGCTCCAGTCCATCGCATGGTGGTCTGG-GAAAG	
<i>B. bifidum</i>		AACGGGTGGTAATGCCGGATGTTCCACATGATCGCATGTGATTGTGG-GAAAG	
<i>B. breve</i>		AACGGGTGGTAATGCCGGATGCTCCATCACCAGCATGGTGTGTGG-GAAAG	
<i>B. catenulatum</i>		AACGGGTGGTAATGCCGGATGCTCCGACTCCTCGCATGGGGTGTGG-NAAAG	
<i>B. pseudocatenulatum</i>		AACGGGTGGTAATGCCGGATGCTCCGACTCCTCGCATGGGGTGTGG-GAAAG	
<i>B. longum</i>		AACGGGTGGTAATGCCGGATGTTCCAGTTGATCGCATGGTCTTCTGCGNAAAG	
<i>B. infantis</i>		AACGGGTGGTAATGCCGGATGTTCCAGTTGATCGCATGGTCTTCTGG-GAAAG	
<i>B. gallicum</i>		AACGGGTGGTAATACCGGATGTTCCGCTCCATCGCATGGTGGTGTGGGAATC	
B		421	482
<i>B. adolescentis</i>		TCGGGTTGTAAACCGCTTTTGACTGGGAGCAAG-----CCTTCGGGG-----TGAGTGTA	
<i>B. angulatum</i>		TCGGGTTGTAAACCGCTTTTGTTGGGAGCAAG-----CCTTCGGG-----TGAGTGTA	
<i>B. bifidum</i>		TCGGGTTGTAAACCTCTTTTGTTGGGAGCAAG-----CCTTCGGG-----TGAGTGTA	
<i>B. breve</i>		TCGGGTTGTAAACCTCTTTTGTTAGGAGCAAGGCA--CTTGTGT-----TGAGTGTA	
<i>B. catenulatum</i>		TCGGGTTGTAAACCNCTTTTGATCGGGAGCAAG-----CCTTCGGG-----TGAGTGTA	
<i>B. pseudocatenulatum</i>		TCGGGTTGTAAACCGCTTTTGATCGGGAGCAAG-----CCTTCGGG-----TGAGTGTA	
<i>B. longum</i>		TCGGGTTGTAAACCTCTTTTATCGGGAGCAAG-----CGAGAG-----TGAGTTTA	
<i>B. infantis</i>		TCGGGTTGTAAACCTCTTTTATCGGGAGCAAG-----CGTGAG-----TGAGTTTA	
<i>B. gallicum</i>		TCGGGTTGTAAACCGCTTTTGATTGTCAGCAAGGCGTCCTTCGGGGATGTTGAGTGTA	

Primer target region. (A) V2 region for forward primers;

(B) V3 region for forward primers;

【図 2】

C

	990	1036
<i>B. longum</i>	CTTGACATGTTCCCGACGGTCGTAGAGATACGGCNTCCCTTCGGGG	
<i>B. infantis</i>	CTTGACATGTTCCCGACGATCCAGAGATGGGGTTCCCTTCGGGG	
<i>B. suis</i>	CTTGACATGTTCCCGACGGCCGTAGAGATACGGCTCCCTTCGGGG	

D

	57	110
<i>B. catenulatum</i>	GCAAGTCGAACGGGATCCGGGAG--TTTGCTGCCTGGNGAGAGTGCGGAAC	
<i>B. pseudocatenulatum</i>	GCAAGTCGAACGGGATCCATCAGGCTTTGCTTGCTGAGAGTGCGGAAC	

(C) V6 region for *B. longum* and *B. infantis* revers primers;(D) V1 region for *B. pseudocatenulatum* forward primer.

E

	991	1035
<i>B. catenulatum</i>	TGACATGTTCCCGACAGCCGTAGAGATACGGNCTCCCTTCGGGG	
<i>B. pseudocatenulatum</i>	TGACATGTTCCCGACAGCCGTAGAGATATGGCCTCCCTTCGGGG	
<i>B. longum</i>	TGACATGTTCCCGACGGTCGTAGAGATACGGCNTCCCTTCGGGG	

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

識別記号

F I

C 1 2 R 1:01)

(C 1 2 Q 1/68

C 1 2 R 1:01)

(72) 発明者 渡辺 幸一

東京都港区東新橋 1 - 1 - 19 株式会社ヤ
クルト本社内

(72) 発明者 田中 隆一郎

東京都港区東新橋 1 - 1 - 19 株式会社ヤ
クルト本社内

(72) 発明者 小柳津 広志

東京都文京区千駄木 2 - 26 - 7 - 501